文章编号：0454-6296（2000）03-0297-08

芥子油苷在甘蓝蚜寄主部位选择行为中的作用

阎凤鸣
（北京大学生命科学学院，北京 100871）

摘要：利用刺吸电位技术（EPG）记录甘蓝蚜 *Brevicoryne brassicae* 在芥菜 *Sinapis alba* 不同部位上的取食行为，同时用高压液相色谱（HPLC）分析芥菜相应部位的芥子油苷（glucosinolates）含量，据此分析芥子油苷在甘蓝蚜对寄主部位偏好行为中的作用。选择芥菜三个部位进行取食行为记录和化学分析，即新出完全叶（第7片）的叶片、叶柄，以及花茎。相对于其它两个部位，甘蓝蚜的口针在花茎上用较少的刺探次数和较短的时间到达韧皮部；一旦口针进入韧皮部持续吸食阶段，蚜虫在三个部位的取食行为没有太大的差异。只在花茎的表皮和皮层中测定到较高含量的白芥子苷（glucosinalbin）。因此，本实验的结果证明，白芥子苷是甘蓝蚜寄主部位选择的关键信号化学物质或取食促进剂。

关键词：芥子油苷；甘蓝蚜；寄主部位选择；高压液相色谱（HPLC）；刺吸电位（EPG）
中图分类号：Q149 **文献标识码**：A

植物和植食性昆虫关系的研究，是近年来化学生态学领域的热点之一。植物的次生物质在植物-昆虫相互作用中发挥着重要作用，它既是植物赖以抵御昆虫的手段，也是昆虫需不断克服的化学屏障，因而是植物-昆虫协同进化的联系纽带。广食性昆虫发展出解毒酶或其它适应机制，但植物的次生物质对其始终是有毒的；而寡食性或专食性昆虫已经突破了某类植物的化学防御，这类植物特有的次生物质反而成为这些昆虫识别寄主的信号物质或取食促进剂（feeding stimulants）。甘蓝蚜和芥菜的关系就符合后一种类型，是研究植物和昆虫化学关系的极好实例。

1962年，McLean 和 Kinsey[1]发明了基于交流电的昆虫刺吸行为监测仪，Tjallingii[2]对该系统进行了改进，设计了使用直流放大器的电生理记录系统，这就是刺吸电位技术（electrical penetration graph，EPG）。EPG的各种波谱对应着刺吸式昆虫的口针在植物内的不同部位以及昆虫的刺探和吸食行为，而这些刺吸行为常常与植物组织内的物理和化学因素相联系，因而EPG是研究刺吸昆虫取食行为、确定对昆虫取食有影响的植物化学因子的存在部位的有效手段。EPG也可以用于研究刺吸式昆虫所传播病毒的传导机制。

甘蓝蚜 *Brevicoryne brassicae* 在世界上温带地区都有发生，其寄主仅限于十字花科植物（Brassicaceae = Cruciferae），包括芥菜 *Sinapis alba*[3]。芥子油苷（glucosinolates）（图1）是十字花科植物特有的次生物质，可以促进甘蓝蚜对寄主的接受和取食[4,5]。在芥菜上，甘蓝蚜特别喜好寄生于正在生长的茎尖部位[6,7]。Gabrys 等用 EPG 记录了甘蓝蚜在芥菜老叶、新出叶、成熟叶和花茎上的取食行为，并分析了这些植物部位中的芥子油苷含量，发现所有植

收稿日期：1999-09-06；修订日期：2000-02-28

物部分都含有三种芥子油苷，即白芥子苷（glucosinalbin = *p*-hydroxybenzyl glucosinolate）、丁烯芥子苷（gluconapin = 3-butenyl glucosinolate）、金莲葡糖硫苷（glucotropaeolin = benzyl glucosinolate），其中白芥子苷约占90%以上[7]。但是，这些分析只是植物部位整体的含量。到底化学物质在植物部位的哪个组织层次对蚜虫的取食起什么作用，目前还不清楚。本研究正是要试图回答这个问题。

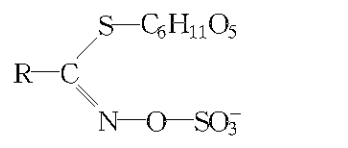


图1 芥子油苷分子式（R=侧链）

Fig. 1 Glucosinolate molecule (R=side chain)

1 材料和方法

1.1 植物和昆虫

芥菜种植于温室花盆内，芥菜上饲养甘蓝蚜，温度20℃，湿度60%，光照16:8（L:D）。用于实验的芥菜在同样条件下种植，防止病虫发生，种植后5～8周用于实验，此时的芥菜有7～8片真叶。

1.2 EPG 记录

从温室采集饲养的无翅成蚜，用小毛笔轻轻刷去蚜虫体表的蜡粉，用水溶性的银粉胶（water soluble silver glue）将长2 cm、直径20 μm的金丝固定于蚜虫背板上，再通过铜丝和铁丝连接于直流放大器上[2]。蚜虫放置于植物的相应部位，记录随即开始。本实验选用的植物部位有：第7真叶叶片（不包括主、次叶脉）、第7真叶叶柄、花茎（茎尖部位与花苞相连处，3～4 cm长）。同时记录8只蚜虫的取食行为，记录时间为8 h。使用STYLET 2.2软件[8]或其改进版将信号记录在PC计算机的硬盘上（转换速率为100 Hz），在记录后对信号作进一步的分析。从叶片、叶柄和花茎上的蚜虫分别成功获得27、18、28次记录。

蚜虫属于在植物韧皮部吸食的类型，蚜虫口针在不同植物组织内所对应的EPG波形主要有3类（图2）：（1）从表皮至吸食部位（韧皮部）前的A、B和C波：A波对应于蚜虫口针刚刚划破植物叶片的行为，与其它波相比，幅度最大，历时很短，只有5～10 s，这种波谱总是伴随着水溶性唾液的分泌；B波紧随A波，与凝胶型唾液鞘的形成有关；C波表明口针的位置在叶表皮与维管束之间，其间有许多电位落差（potential drops，pd），每个pd持续5～15 s，即表明口针已刺入细胞膜内。由于A、B、C三种波出现于口针从叶表皮至吸食部位（韧皮部）的途中，常被看作一种波形，称为路径波（pathway waveforms），统称为C波。（2）G波，表明口针在木质部。（3）韧皮部吸食对应的E1和E2。E1表明唾液分泌，E2表明韧皮部的被动吸食过程。E2长于10 min，则认为蚜虫在韧皮部的持续吸食[7]。EPG各种波形生物学意义的具体介绍，请参见雷宏和徐汝梅[9]。

为衡量蚜虫在植物不同组织内的取食行为反应，将整个记录过程分为三个阶段：第1阶段从刺吸开始到第1个E1出现；第2阶段从第1个E1出现到第1次韧皮部持续取食（E2长于10 min）；此后至记录结束为第3阶段。选取14种指标（parameters）对蚜虫不同部位的取食行为进行分析（图3，表1）。

1.3 芥菜组织原生质体的分离

刺吸电位记录完毕，马上将芥菜植株的新出真叶及叶柄、花茎剪下，称重冲洗后放入冰

图 2　EPG 波谱

Fig. 2　EPG waveforms

1 h EPG 记录中各种波谱可能出现顺序的全貌（上）及某些指标（中）　An one hour overview of a possible sequence of all waveform phases (top) and some parameters (middle): probe. 口针的一次刺探；np. 非刺探时期；path. 口针在植物组织内的运动过程；xylem. 木质部吸食期；phloem. 韧皮部吸食期；parameters. 指标；phloem sieve element. 韧皮部筛管汁液吸食。重要波谱的细节图（下）　Details of separate waveforms (bottom): 见文内详细解释 Detailed explanations of each waveforms as seen in text

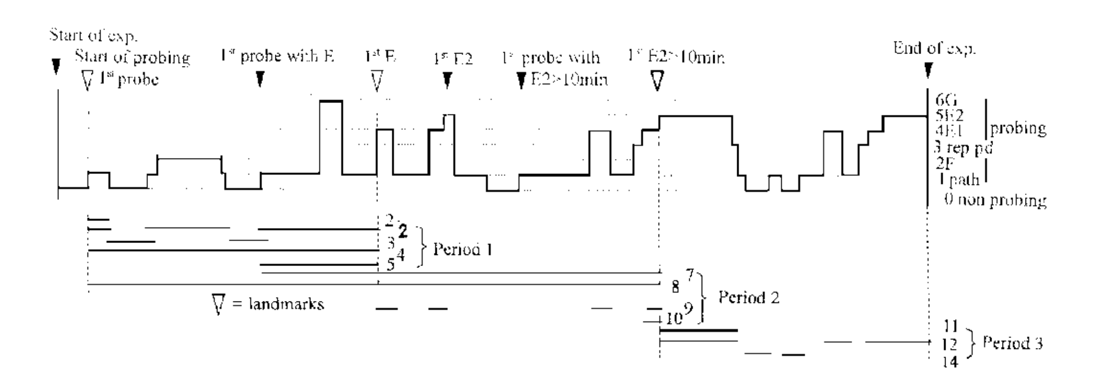


图 3　本研究所选用的指标示意图（数字所对应指标的详细解释见表 1）

Fig. 3　Schematic diagram of parameters used (detailed explanations of each parameter as shown in Table 1)

Start of exp. 实验开始；start of probing，first probing　刺探开始，第一次刺探；1st probe with E　第一次出现 E 波的刺探；end of exp. 实验结束；period 1，2，3　第 1、2、3 阶段；landmarks 重要转折点；指标 6 和 13 为非次序性指标（百分比），未在此图中表示，见表 1。

Non-sequential parameters 6 and 13 are not shown in the figure but shown in Table 1

箱冷冻室，在 -20℃条件下冷冻3 min后取出，在实体镜下用尖头镊子分离表皮和叶肉（或皮层），放入由0.6 mol/L甘露醇、1 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、2%果胶酶（pectinase）(v/v）和0.5%纤维素酶（cellulase）（v/v）所配成的溶液中，黑暗条件下在30℃水浴中保持3～4 h，以60目尼龙筛网过滤，去除残渣，原生质体混浊液700 r/min离心3 min，用清洗液（0.6 mol/L甘露醇和1 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$）小心清洗3次，以充分去除果胶酶和纤维素酶。取少量液体，加1～2滴荧光素二乙酸酯（fluorescein diacetate，FDA）储备液（荧光素二乙酸酯100 mg溶解在20 mL丙酮内，冰箱中避光保存），在荧光显微镜下检查计数活的原生质体和测量其直径。活的原生质体呈鲜绿色，破裂或死亡的呈深黄色或棕色。原生质体混浊液迅速在100℃水浴中煮10 min，以钝化芥子油苷水解酶。溶液在1 600 r/min下离心5 min，取上清液加水至一定体积，冰箱冷藏备用。

1.4 韧皮部汁液收集

将花茎、新出真叶（第7片）叶片、新出真叶叶柄剪下称重，分别放入乙二胺四乙酸（依地酸）（ethylenediamine tetraacetic acid，EDTA）溶液中，24 h后将提取液冷冻干燥，加入一定量的蒸馏水，冷藏备用。

1.5 蚜虫蜜露收集

甘蓝蚜置于芥菜植株上，在第7片真叶叶片、叶柄、花茎（使其固定在金属支架上呈水平状态）下各放置一个盛有正十六烷（n-hexadecane）的培养皿，寄生以上部位的蚜虫的蜜露落入皿中油内，不致挥发。每天用毛细玻管收集蜜露，离心后冷冻保存备用。

1.6 化学分析

芥子油苷含量测定按照Betz和Page[10]的方法在高压液相色谱上进行。使用30 mm预置柱和250 mm × 4 mm C18RP高压液相色谱分析柱（Nucleosil 120-5 C18，颗粒大小5 μm）（Macherey and Nagel公司），注样20 μL，以25%乙醇和0.005 mol/L TAS（硫酸四丁铵）（tetrabutylammonium hydrogen sulfate）的均匀混合溶液作流动相，流速为1 mL/s，运行25 min。使用Varian 2050紫外记录仪和HP-3395综合仪在227 nm波长下检测样品，以纯芥子油苷溶液做对照，比较紫外光谱、滞留时间和峰面积，对样品中的芥子油苷进行定性和定量分析。

1.7 分析统计

记录在PC计算机硬盘上的EPG信号，在STYLET分析程序下显示为波谱图，根据所选用的指标进行分析；根据高压液相色谱的测定结果、原生质体的体积（根据直径换算）、一定溶液中原生质体的浓度，换算出各部位一定体积原生质体中芥子油苷的含量。使用STATGRAPHICS 6.0统计软件进行统计分析，各处理间的显著性差异均设为 $P = 0.05$ 水平。

2 结果和分析

2.1 EPG记录

第1阶段（蚜虫口针处于表皮和韧皮部之间的过程）：蚜虫在花茎上的刺探次数、非刺探时间明显少于另两个部位，而在花茎上第1次刺探即可到达韧皮部的蚜虫百分比则明显高于在叶片和叶柄上的蚜虫百分比，表明蚜虫在刺探过程中，花茎是其较偏好的部位；第2阶段（第1次韧皮部刺探到第1次韧皮部持续吸食）：与其它两个部位相比，在花茎上此阶段极短，

也就是说，一旦蚜虫口针到达韧皮部，即可开始持续吸食；在花茎上蚜虫从开始刺探至持续吸食所用时间最短；第 3 阶段（开始持续吸食至记录结束）：蚜虫在三个部位上的表现没有明显的差异（表 1）。

表 1　刺吸电位（EPG）记录的甘蓝蚜取食行为

Table 1　EPG recorded feeding behaviors of the cabbage aphid

指标 Parameters	植物部位 Plant parts		
	叶柄（18*）Petioles	叶片（27）Laminas	花茎（27）Stems
第 1 阶段（从刺吸开始至第 1 次到达韧皮部） Period Ⅰ（from start of penetration to phloem）			
1. 刺吸次数　Probes（N）	6.11 a**	4.74 a	0.48 b
2. 短于 2 min 的刺吸次数　Probes＜2 min（N）	3.17 a	2.19 a	0.19 b
3. 非刺吸时间所占%　Non-probing %	12.65 a	11.38 a	1.73 b
4. 本阶段所用时间　Time to 1st phloem phase within exp.（h）	2.48 a	1.47 a	1.58 a
5. 第 1 次到达韧皮部所用时间（min） Time to 1st phloem phase within probe（min）	81.48 a	48.10 b	77.47 a
6. 第 1 次刺吸就到达韧皮部的蚜虫（%） Aphids with phloem phase in 1st probe（%）	44	41	78
第 2 阶段（从第 1 次到达韧皮部至第 1 次韧皮部持续吸食） Period Ⅱ（from 1st phloem phase to first sustained phloem ingestion）			
7. 本阶段所用时间　Duration of Period Ⅱ（min）	10.48 b	55.65 a	1.24 c
8. 在整个记录中，至第 1 次韧皮部持续吸食所用时间（h） Time to 1st sustained phloem ingestion within exp.（h）	2.65 a	2.85 a	1.54 b
9. 第 1 次持续吸食前，韧皮部唾液分泌的总时间（min） Total phloem salivation before 1st sustained ingestion（min）	1.77 b	3.38 a	1.22 b
10. 恰在第 1 次持续吸食前的那 1 次韧皮部唾液分泌的时间（min） Phloem salivation just before 1st sustained ingestion（min）	1.46 a	1.36 a	1.22 a
第 3 阶段（第 1 次韧皮部持续吸食至记录结束） Period Ⅲ（from 1st sustained phloem ingestion onwards）			
11. 第 1 次韧皮部持续吸食所用时间（h） Duration of 1st sustained phloem ingestion period（h）	3.32 a	3.56 a	2.96 a
12. 第 1 次到达韧皮部即能持续吸食的蚜虫（%） Aphids in 1st phloem phase included sustained phloem ingestion（%）	83	37	100
13. 第 1 次韧皮部持续吸食后，韧皮部相所占时间的百分比（%） Time in phloem phase after start of 1st sustained phloem ingestion（%）	72.02 a	79.09 a	75.28 a
14. 第 1 次韧皮部持续吸食后的刺探次数（N） New probes after 1st sustained ingestion（N）	0.83 b	2.19 a	0.85 b

* 部位后括号内的数字表示在该部位上成功记录的蚜虫数（重复数）
Numbers of aphids that were recorded successfully（replicates）

** 统计分析使用 Whitley-Mann U test，不同处理间的差异显著性（$P=0.05$）用数字后的不同字母表示
Different letters indicate significant differences between treatments at $P=0.05$ level under Whitley-Mann U test

2.2 化学分析

在本试验中，三种芥子油苷只检测出一种，即白芥子苷。在来自叶片的各个样品（表皮、叶肉、EDTA浸提液和蚜虫蜜露）中没有测定到；在来自叶柄的EDTA浸提液和蚜虫蜜露中含极微量的白芥子苷，而该物质在花茎的各个样品中均可以测定到，且在花茎表皮和皮层中含量很高，其中又以皮层中含量最高（表2）。

表2 芥子油苷在芥菜中的含量（mmol/L）

Table 2 Glucosinolate profile in *S. alba*（mmol/L）

样品来源 Sample source	白芥子苷 G-sinalbin	丁烯芥子苷 G-napin	金莲葡糖硫苷 G-tropaeolin
叶片 Laminas			
表皮 Epidermis	——*	——	——
叶肉 Mesophyll	——	——	——
韧皮部液 Phloem sap	——	——	——
蚜虫蜜露 Aphid honeydew	——	——	——
叶柄 Petioles			
表皮 Epidermis	——	——	——
皮层 Cortex	——	——	——
韧皮部液 Phloem sap	+	——	——
蚜虫蜜露 Aphid honeydew	+	——	——
花茎 Stems of flower buds			
表皮 Epidermis	1.99 ± 0.23 a**	——	——
皮层 Cortex	5.77 ± 2.29 b	——	——
韧皮部液 Phloem sap	+	——	——
蚜虫蜜露 Aphid honeydew	+	——	——

* “——”表示测不到含量，“+”表示可测到，但含量极低

“——” indicates non-detectable and “+” detectable with extremely low concentration

** 处理间的差异显著性（$P=0.05$）用不同字母表示（Whitley-Mann U test）

Different letters indicate significant differences between treatments at $P=0.05$ level under Whitley-Mann U test

3 讨论

（1）昆虫对于寄主植物的接受或拒绝，依赖于外部有利刺激和不利刺激的综合影响以及内部生理和神经反应[11]。次生物质在昆虫对于寄主选择和部位偏好的行为中起着重要的作用，但对食性宽窄不同的昆虫影响程度不同[12]。植物次生物质和营养物质的丰富程度对于广食性昆虫取食行为均有影响；而专食性昆虫对寄主和部位的选择，在很大程度上依赖于寄主植物特有的次生物质的存在及其分布，这些次生物质的缺乏可导致昆虫对植物的拒绝，而这些物质的存在则可使专食性昆虫取食非寄主植物。例如，将黑芥子硫苷酸钾（sinigrin = potassium myronate）涂于甘蓝蚜的非寄主植物蚕豆 *Vicia faba* 嫩叶上，甘蓝蚜居然可以在其

上取食[13]。因而，芥子油苷是甘蓝蚜的部位选择的信号物质或取食促进剂。

虽然营养物质也在一定程度上影响甘蓝蚜的行为[14]，但高含量的芥子油苷似乎是甘蓝蚜偏好花茎的决定性条件。从表 1 中可以看出，蚜虫口针一旦到达韧皮部，其取食行为在三个部位基本一致，说明在花茎、嫩叶和叶柄中营养物质似乎没有太大的差异；取食行为的不同，主要表现在口针穿过表皮和叶肉（皮层）时 EPG 指标（第 1 阶段）的显著性差异，证明蚜虫口针在花茎上用较少的刺探次数和较短的时间到达韧皮部。刺探次数和到达韧皮部的时间，可能受到两个因素即机械障碍和化学物质的影响。但叶片的机械障碍应当最小，叶柄和花茎相类似。因此，化学物质的差异可以说是蚜虫取食部位选择的重要决定因素。

（2）芥子油苷的组成和含量随植物的株龄不断变化[15]，Bodnaryk 证实，在芥菜生长的早期阶段，白芥子苷含量降低很快[16]。Garbrys 等测定出三种芥子油苷[6]，而本实验只测定到一种，可能就是实验中所用芥菜的株龄不同造成的（进行本实验时，正值冬季，温室内气温相对偏低，芥菜生长至 7～8 片真叶时所用时间比正常室温下要长 2 周左右）。本研究只在花茎中测定到较高含量的白芥子苷，而花茎又是甘蓝蚜偏好的取食部位，因此我们有理由认为，白芥子苷在甘蓝蚜寄主部位选择中起到重要的刺激作用。另外两种芥子油苷可能是由于含量极微而未能测到，或者在本实验所用植株中根本不存在。如果含有而没测到，就不能说明它们在蚜虫取食中不起作用。今后的工作，应当包括蚜虫在芥菜不同时期的 EPG 行为记录和芥子油苷化学分析，结合在加入一定浓度和配比的芥子油苷的人工饲料上，仔细观察蚜虫的取食行为（结合 EPG 和生物测定），就可以全面了解芥子油苷在蚜虫寄主部位偏好中所起的实际作用。

致谢　荷兰瓦赫宁根农业大学昆虫学系（Department of Entomology，Wageningen Agricultural University，the Netherlands）的 Freddy Tjallingii 博士给予了具体的指导和帮助，并在本文的写作中与作者进行了有益的讨论。实验中得到了雷宏、Anas Cherqui、Dick van der Wal 等的帮助。本研究的 EPG 和化学分析实验分别在荷兰瓦赫宁根农业大学昆虫学系和化学系完成，得到了两系同事和实验人员的配合。在此一并致谢。本课题由荷兰皇家科学院资助；资料的整理和发表，得到了国家教育部归国人员启动基金的资助。

参　考　文　献　（References）

[1] McLean D L，Kinsey M G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. Nature，1964，202：1 358～1 359

[2] Tjallingii W F. Electrical recording of stylet penetration activities. In：Minks A K，Harrweijn P eds. Aphids，Their Biology，Natural Enemies and Control. Vol. 2B. Elsevier，Amsterdam，1988. 95～108

[3] Blackman R J，Eastop V F. Aphids on the World Crops：An Identification Guide. New York：John Wiley & Sons，1985. 423

[4] Nault L R，Styer W E. Effects of sinigin on host selection by aphids. Entomol. Exp. Appl.，1972，15：423～437

[5] Fenwick G R，Heaney R K，Mullin W J. Glucosinolates and their breakdown products in food and foodplants. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.，1983，18：123～202

[6] Gabrys B. Distribution of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on yellow mustard plant. In：Proceedings of Conference in Insect Chemical Ecology，Tabor，Academia，Prague，and SPB Academic Publishers，The Hague，1991. 303～305

［7］ Gabrys B，Tjallingii W F，van Beek T A. Analysis of EPG recorded probing by cabbage aphid on host plant parts with different glucosinolate contents. J. Chem. Ecol.，1997，23（7）：1 661～1 673

［8］ Tjallingii W F，Mayoral A. Criteria for host-plant acceptance by aphids. In：Menken S B J，Visser J H，Harrewijn P eds. Proceedings 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships，Dordrecht：Kluwer Academic Publishers，1992. 280～282

［9］ 雷 宏，徐汝梅. EPG——一种研究植食性刺吸式昆虫刺探行为的有效方法. 昆虫知识，1996，33（2）：116～120

［10］ Betz J M，Page S W. Liquid chromatographic method for the determination of intact，non-derivatized glucosinolates from Brassicaceae. In：Proceedings of the Symposium Biology and Chemistry of Active Natural Substances. Bonn，July 1990. 103～104

［11］ Dethier V G. Mechanisms of host-plant recognition. Entomol. Exp. Appl.，1982，31，49～56

［12］ 钦俊德. 昆虫与植物的关系——论昆虫与植物的相互作用及其演化. 北京：科学出版社，1987

［13］ Wensler R J D. Mode of host selection by an aphid. Nature，1962，195：830～831

［14］ Weber G，Oswald S，Zollner U. Suitability of rape cultivars with a different glucosinolate content for *Brevicoryne brassicae*（L.）and *Myzus persicae*（Sulzer）（Hemiptera，Aphididae）. J. Plant Dis. Prot.，1986，93：113～124

［15］ Clossais-Besnard N，Larher F. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. J. Sci. Food Agric.，1991，56：25～38

［16］ Bodnaryk R P. Development profile of sinalbin（*p*-hydroxybenzyl glucosinolate）in mustard seedlings，*Sinapis alba*，and its relationship to insect resistance. J. Chem. Ecol.，1991，17：1 543～1 556

Role of glucosinolates in the host plant part preferences by the cabbage aphid，*Brevicoryne brassicae*

YAN Feng-ming

（College of Life Sciences，Peking University，Beijing 100871，China）

Abstract：Feeding behavior of the cabbage aphid（*Brevicoryne brassicae*）was recorded with electrical penetration graph（EPG）and glucosinolates in tissues of mustard（*Sinapis alba*）parts were analyzed with HPLC to investigate the roles of glucosinolates in the host plant part preference by the aphid. Three plant parts of mustard were chosen for EPG recording and chemical analysis，i.e.，the laminas and petioles of the 7th fully expanded leaves，and stems of flower buds. Stylets of the aphids on the stems could reach the phloem with less probes and shorter time compared to those of aphids on other two parts. And no significant differences were found in feeding behaviors among aphids on three plant parts once sustained ingestion started in the phloem. Only sinalbin of three glucosinolates was found from epidermis and cortex in the stems of flower buds. Our results indicate that sinalbin is an important indicative chemical or feeding stimulant in host plant part preference by the cabbage aphid.

Key words：glucosinolates；*Brevicoryne brassicae*；plant part preference；HPLC；EPG